

## TÜTÜNE *Agrobacterium tumefaciens* ARACILIĞIYLA (*Nicotiana tabacum*) GEN AKTARIMINDA SICAKLIĞIN ETKİSİ

Turgay ÜNVER<sup>1</sup> Khalid M. KHAWAR<sup>2</sup> İskender PARMAKSIZ<sup>2</sup> Leyla AÇIK<sup>1</sup>

1. Gazi Üniv. Fen Edebiyat Fak. Biyoloji Böl 06500, Beşevler. Ankara

2. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl. 06110. Dışkapı. Ankara

**ÖZET:** Değişik çevresel faktörlerin bitkilerin büyüme ve gelişmesi üzerinde önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Çevresel stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. *In vitro* koşullarda *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla bitkilere gen aktarımında önemli olan faktörlerinden birisi de sıcaklıktır. Tütün; gen aktarımı çalışmalarında model bitki olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada tütünün Samsun çeşidi kullanılmış olup, gen aktarım çalışmalarında 22°C sıcaklığının en etkin olduğunu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Tütün, *Agrobacterium tumefaciens*, sıcaklık

### EFFECT OF TEMPERATURE ON *Agrobacterium tumefaciens* MEDIATED TRANSFORMATION OF TOBACCO

**SUMMARY:** Various abiotic factors play important role in plant development and production. Environmental stress comes from biologic and abiotic factors. Temperature is an important factor than effects gene transfer process by *Agrobacterium tumefaciens*. Tobacco is generally used as a model plant in gene transfer studies. Tobacco variety Samsun was used in the study to find the effect of temperature and was found that 22 °C was the most effective temperature for the gene transfer studies.

**Key Words:** Tobacco, *Agrobacterium tumefaciens*, temperature

### GİRİŞ

Tütün (*Nicotiana tabacum*) *Solanaceae* familyasına ait bir tür olup, önemli bir üretim potansiyeline sahiptir. 18. yüzyıldan itibaren geleneksel bir tarım türü olan tütüncülük. Türkiye'nin birçok bölgesinde yaygın hale gelmiştir. Tütün; ülkemizde iç tüketimi karşılamak ve ihracat amacıyla üretilmektedir. Türk tütünleri üretim bölgelerine göre 4 guruba ayrılmaktadır. Bu bölgeler: Ege, Marmara-Trakya, Karadeniz, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgeleridir. Genel olarak *Solanaceae* familyasındaki bitki türlerinin *in vitro* regenerasyon kabiliyetleri yüksek olup, *Agrobacterium* enfeksiyonuna karşı da oldukça hassastırlar. Özellikle tütün, gen aktarım çalışmalarında model bitki olarak kullanılmaktadır (Özcan ve ark. 2001). Değişik organizmalardan izole edilen genler öncelikle bu bitkide test edilmektedir. İlk olarak *A. tumefaciens* aracılığı ile tütün yaprak disklerine gen aktarımı Horsch ve ark (1985) tarafından yapılmıştır. Günümüzde biyolistik, elektroporasyon, mikroenjeksiyon ve *A. tumefaciens* aracılığı ile birçok bitki türüne gen aktarımı yapılabilmektedir. Gen aktarımında en yaygın olarak kullanılan araç *A. tumefaciens* bakterisidir. Bu bakteri yardımıyla tütün, patates (Uranbey ve ark.2001), kolza (Mirici ve ark. 2001) ve mercimek (Khawar ve Özcan

2002) gibi birçok kültür bitkisine gen aktarımı başarılı ve sürekli bir şekilde yapılabilmektedir. *A. tumefaciens* bakterisi *Rhizobiaceae* familyasına ait olup, doğal genetik mühendisi olarak adlandırılmaktadır. *A. tumefaciens* gram (-) bir bakteridir. Enfeksiyon sonucu bitkilerde kök boğazı uru hastalığına sebep olmaktadır. Bunu da taşıdığı Ti (lümör oluşturma) plasmidi sayesinde sağlamaktadır. Ti plasmidi bitkilere gen aktarımı için Virülens bölgesini ve T-DNA bölgesini içermektedir (Özcan ve ark. 2001).

Değişik çevresel faktörlerin bitkilerin büyüme ve gelişmesi üzerinde önemli etkilerinin olduğu bilinmektedir. Çevresel stres faktörleri biyotik ve abiyotik olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Biyotik stres başka organizmalar tarafından enfeksiyon veya organizmalar arasındaki rekabeti içermektedir. Abiyotik stresler (fiziko kimyasal): sıcaklık, değişim kimyasallar, kuraklık, ışık, radyasyon gibi dış (çevresel) faktörler sayılabilir. *In vitro* koşullarda gen aktarımı yaparken en etkileyici çevresel faktörlerden birisi de sıcaklıktır. Bu çalışmada da *A. tumefaciens* aracılığıyla tütüne gen aktarımında sıcaklığın etkisi araştırılmıştır.

### **Bitki Materyali**

Araştırmada Samsun tütün çeşidi kullanılmıştır. Steril koşullarda büyütülen bitkilerden elde edilen tütün yaprakları bisturi yardımıyla kesilerek 0.5 cm büyüklüğünde parçalara ayrılarak gen aktarımında kullanılmıştır.

### ***Agrobacterium Tumefaciens* Materyali**

Çalışmada non-onkogenik GV2260 p35S GUS-INT *A. tumefaciens* hattı kullanılmıştır. p35S GUS-INT plazmid T-DNA bölgesinde seçici NPT-II ve gözlenebilen GUS markör genlerini taşımaktadır.

### **Bakterinin Uzun Süreli Muhafazası**

Bakteri kültürleri "Nescofilm" ile sarılmış, ters çevrilen petri kutularında 4°C'de 6 hafta korunmuştur. Daha uzun süreli muhafaza işlemi, eşit miktarda bakteri kültürü ve %40 glycerol içeren NB (Nutrien Broth), 2 ml'lik cryogenik tüplerde karıştırıldıktan sonra sıvı azotla hızlı bir şekilde dondurulup, -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bu yolla bakteri kültürlerinin canlılığını 10 yıl boyunca muhafaza etmek mümkün olmaktadır (Armilage ve ark. 1988).

### **Besin Ortamı ve Kültür Koşulları**

Rejenerasyon ortamı olarak %8 agar ile katılaştırılan MS (Murashige ve skoog 1962) besin ortamına 1 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA ilave edilmiştir. pH'sı 5.7 ye ayarlandıktan sonra ortam otoklavda 121°C'de ve 1,4 Kg cm<sup>2</sup> basınç altında 20 dakika süreyle steril edilmiştir. Tütün yaprak disklerinin bakteri ile inokulasyonunda sıvı ko-kültivasyonunda ise katı rejenerasyon ortamı kullanılmıştır. Transgenik sürgün adaylarının seçilmesi için ise rejenerasyon ve köklendirme ortamına (MSO) 50 mg/l kanamisin ve 500

mg/l Augmentin ilave edilmiştir. Ko-kültüvasyon; 18, 20, 22, 24, ve 28°C'de beyaz floresan ışık altında (42 µ. mol fotonlar m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) ve 16 saatlik fotoperiyot koşullarında gerçekleşmiştir.

### **Agrobacterium Tumefaciens ile Tütün Yaprak Disklerinin İnokülasyonu**

2260 p35S GUS-INT *A.tumefaciens* hattı 28° C'de 50 mg/l kanamisin ve 100 mg/l rifampisin içeren sıvı NB ortamında 1-2 gün süreyle büyütülmüş, daha sonra sekiz haftalık *in vitro* koşullarda büyüyen tütün bitkilerinden 0,5 cm çapındaki yaprak diskleri sıvı rejenerasyon ortamı ile 1/50 oranında seyrettilen bu bakteri kültürleri içerisinde 30 dakika süreyle bekletilerek inokülasyon sağlanmıştır. İnokülasyondan sonra eksplantlar 2 gün süreyle rejenerasyon ortamında 18, 20, 22, 24 ve 28°C ko-kültüvasyona alınmıştır. Eksplantların etrafında aşırı bakteri gelişimi olduğu durumlarda, eksplant 1000 mg/l augmentin içeren sıvı rejenerasyon ortamında yıkandıktan sonra steril kurutma kağıtlarında kurutulmuştur. Bundan sonra, eksplantlar *Agrobacterium* gelişimini önlemek için augmentin (500 mg/l), sadece gen aktarılmış sürgünlerin gelişimini sağlamak için de kanamisin (50 mg/l) içeren rejenerasyon (MSD 4X2 : MS+1 mg/l BAP+0.1 mg/l NAA) ortamına aktarılmıştır. Bu ortamda gelişen kalluslar sürekli olarak kontrol altında tutularak aktarılan genlerin belirtileri gözlenmiştir. Buradan gelişen kanamisine dayanıklı transgenik sürgün adayları 500 mg/l augmentin ve 50 mg/l kanamisin içeren MS ortamında köklendirilmiştir.

### **Histokimyasal GUS Analizi**

Histokimyasal GUS analizi Jefferson (1987) ve Özcan (1993) 'in tarif ettiği şekilde yapılmıştır. Bitki dokuları 100 mM sodyum fosfat (pH=7.0), 10mM EDTA, %0.1 Triton X -100 ve 1 mM 5 bromo-4 chloro 3 mdolyl glucoronide (X-GLUC) içeren solüsyonda 37°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular %70'lik alkolde yıkanarak mavi bölgeler belirlenmiştir.

### **BULGULAR VE TARTIŞMA**

Bu denemede *in vitro* şartlarda yetiştirilen Samsun tütün çeşidinin yaprak diski eksplantlarına onkogenik olmayan *A. tumefaciens* GV2260 p35S GUS-INT aracılığıyla farklı sıcaklık derecelerinde (18, 20, 22, 24 ve 28°C) gen aktarımı yapılmıştır. 18°C ve 20°C hariç diğer bütün sıcaklıklarda başarılı bir şekilde gen aktarımı yapılmıştır. Gen aktarılmış bitkilerde eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant ağırlığı incelenmiştir. Bütün incelenen sıcaklıklarda eksplant başına sürgün sayısı ve eksplant ağırlığı 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Eksplant başına kallus oluşumu ve antibiyotiğe karşı dayanıklı sürgün oluşturan eksplant yüzdesinin analizi yapılmamıştır. Çünkü bunların değerleri % 100 olarak gözlenmiştir. Kalluslardan sürgün oluşumu dikkate alındığında ise en başarılı sonuçların sırasıyla 22°C ve 24°C'den alındığı görülmektedir (Çizelge 1).

Bütün eksplantlara histokimyasal GUS analizi yapılmıştır. Alınan örnekler maviye boyanarak GUS pozitif bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı, eksplant ağırlığı, GUS pozitif değeri farklılıklarının önem düzeyini belirlemek için yapılan Duncan testi sonuçları

Çizelge l'de verilmiştir. Duncan testine göre 18, 20, 22, 24 ve 28°C'de yapılan denemeler sonucunda 22°C ve 24°C'nin en iyi sonucu verdiği görülmüştür. Eksplant başına sürgün sayısı arasındaki farklılık 41.73 (28°C) ve 85.0 (22°C) adet olarak bulunmuştur. Eksplant ağırlığı bakımından en yüksek değeri 1.08 g (22°C) ve en düşük değeri 0.36 g (20°C) olarak bulunmuştur. İnceleme yaparken 18°C, 20°C ve 28°C de sürgün gelişimi görülmektedir. Fakat bunlarda bakteri gelişimi de gözlenmiştir ve bakteriler sürgün gelişiminde engel teşkil etmiştir. Birçok bitkide kanamisin, dayanıklılığı test etme amacıyla kullanılmaktadır. Ancak bazen bitkiler doğal olarak kanamisine dayanıklı olabilmektedirler. Bundan dolayı kanamismle test ettiğimiz bitkilerden oluşan yeni sürgünlerin tamamı transgenik olmamaktadır. Bu tür sürgünlere kaçak sürgün adı verilmektedir (Horsch et al 1985). Bu araştırmamızda inkübe olan dokulardaki GUS pozitif transgenik sürgün frekansı % 12.4 dür ve 22°C'de toplam 1 8 adet sürgün GUS pozitif olarak bulunmuştur (Draper et al 1988). Sonuçta eksplant ağırlığı ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından 22°C'nin daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Histokimyasal GUS analizinde 22°C'deki sürgünler %75 olarak ve geri kalan ise 0-%25 arasındaki değerlerde GUS pozitif çıkmıştır. Genel olarak bu çalışma sonucunda gen aktarımında en etkileyici sonuçların 22°C'den alındığı söylenilebilir. Aynı şekilde Myers vd. (1999) Dahlon (1999) ve Kondo vd. (2000) gen aktarım çalışmasında sıcaklığın etkisinin olduğunu belirtmişler ve 22°C'nin önemini vurgulamışlardır.

Çizelge 1. *A. tumefaciens* GV 2260 p35S GUS-INT Hattı ile Farklı Sıcaklıklarda Tütüne Gen Aktarımına Ait Değerler

Sıcaklık °C	Eksplant Ba; Sürgün	fina Sayısı	Transgenik Sürgün	Sayısı	Eksplant Ağırlığı		GUS Pozitif (%)	
18	55.8	c	0	d	0.55	be	0	e
20	61.40	be	6	be	0.36	b	25	b
22	85.0	a	18	a	1.08	a	75	a
24	78.93	ab	12	b	0.77	b	25	b
28	41.73	cd	3	c	0.52	e	0	c

\*0,01 düzeyinde önemli

## KAYNAKLAR

- ARMITAGE P, WALDEN R, DRAPER J. 1988. Vectors for the transformation of plant cells using *Agrobacterium*. İn: "Plant genetic transformation and gene expression, a laboratory manual" J Draper, R Scott, P Armitage, R Walden, (Eds) pp 1-67. Blackwell Scientific Pub. Oxford.
- DAHLON LS (1999). Donor plant environment effects on regeneration from barley embryo derived callus. Crop Sci. 39: 682-685

- DRAPER, J, SCOTT, R, HAMİL, J. 1988 a. Transformation of Dicotyledonous plant Cells using the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* and the R<sub>1</sub> plasmid of *A. rhizogenes*. Plant genetic transformation and Gene expression. A lab. Manual. 71-160. Draper, J., Scott, R., Armitage, P., Walden, R. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- HORSCH RB, FRY JF, HOFFMAN NL, EICHOLTZ D, ROGERS SG, FRALEY RT. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. Science. 227: 226-228.
- JEFFERSON RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-405
- KHAWAR KM, ÖZCAN S. (2002). in vitro Induction of Crown Galls by *Agrobacterium tumefaciens* Süper Virulent Strain A281 (pTİBo 542) in Lentil (*Lens Cu/inaris* Medik.). Türk J Bot. 26: 165-270.
- KONDO, HASEGAUOA H. SUZUKI M.(2000). Genetic transformation and regeneration of garlic (*Allium Sativum* L) by *Agrobacterium* mediated gene transfer. Plant Celi Rep. 19: 989-993
- MİRİCİ S, ÖZCAN S, SANCAK C, ARSLAN O. 2001. Kolza (*Brassica napus* L. ssp. *Oleifera*) ya *A. tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımı. XII. Biyolekoloji kongresi 17-21 Eylül 2001. Ayvalık-Balikesir.
- MURASHIGE T, SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- MYERS JM. SIMON P.W. 1999. Regeneration of garlic callus as affected by clonal variation. plant growth regulators and culture conditions over time. Plant Celi Reports (19):32-36
- ÖZCAN S. 1993. Tissue culture in pea and engineering a marker gene for specific expression in target cells for plant transformation. Ph.D. thesis. Dept Bot. Univ. Leicester, UK.
- ÖZCAN. S.. URANBEY. S., SANCAK, C, PARMAKSIZ L GÜREL E., BABAOĞLU M. 2001 *Agrobacterium* Aracılığıyla Gen Aktarımı. In : Özcan, S. Gürel, S.. Babaoğlu. M. Bitki Biyolekolojisi II. -Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, (ed.). Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları. Sayfa 1 12-159. ISBN 975-6652-05-5.
- URANBEY S, ÖZCAN S. SANCAK C, ER C. 2001. Patojen ilişkili genlerin transgenik, patates bitkilerindeki ekspresyonu. XII. Biyoteknoloji kongresi 17-21 Eylül 2001. Ayvalık-Balikesir.